

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-101984

(43)Date of publication of application : 18.04.1995

(51)Int.Cl.

C07K 5/107  
C07K 7/02  
C07K 7/06  
C07K 14/705  
// A61K 38/00  
A61K 38/00

(21)Application number : 05-277294

(71)Applicant : SUNTORY LTD

(22)Date of filing : 30.09.1993

(72)Inventor : KITAJIMA YASUO  
SHIMAMOTO TETSUO  
ISHIGURO MASAJI

## (54) PEPTIDE DERIVATIVE

### (57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a peptide derivative, having inhibiting activities against blood platelet agglutination and providing expectable usefulness as a therapeutic agent for circulatory diseases.

CONSTITUTION: This peptide derivative is expressed by the formula X-Phe-Leu- Leu-Arg-(Asn)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub> (X denotes formyl group, acetyl group, a substituted or an unsubstituted  $\geq 4$ C alkylcarbonyl group, a substituted or an unsubstituted aralkylcarbonyl group, a substituted or an unsubstituted arylcarbonyl group, hydroxypropionyl group which may be branched,  $\beta$ -alanine residue,  $\alpha$ - or  $\beta$ - aminoisobutyric acid residue or isoserine residue; n denotes 0 or 1) and an acid addition salt thereof.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against  
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

\* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the peptide derivative which checks platelet aggregation. It is related with a new thrombin receptor antagonism peptide derivative in more detail.

[0002]

[Description of the Prior Art] A thrombin participates in the coagulation system of blood, changes a fibrinogen into a fibrin in a culmination, and makes blood solidify. In addition, having platelet agglutination, a blood vessel smooth muscle cell proliferation operation, and vascular endothelial cell multiplication is known. In the coagulation system of blood, the role of a thrombin is studied by the detail and the cascade of blood coagulation is also clarified.

[0003] On the other hand, about the manifestation device of the platelet agglutination of a thrombin, a blood vessel smooth muscle cell proliferation operation, and vascular endothelial cell multiplication, it was unknown. However, the structure of the receptor activated by the thrombin recently became clear from the analysis of cDNA to mRNA taken from the Dami cell (Cell, 64 (1991) p.1057-1068). Moreover, it became clear also about the operation of the thrombin to a platelet (Nature, 353(1991) p.674-677). According to it, the receptor activated by the thrombin is the so-called G protein conjugation receptor called a thrombin receptor, and a thrombin cuts one by the side of the amino terminal of the polypeptide part which has come out to the outside of the platelet cell membrane of a thrombin receptor. It was shown clearly that the peptide of the amino terminal part produced newly combined with the receptor itself, and signal transduction happened by the cutting.

[0004] Moreover, peptide which consists of 14 amino acid equivalent to this amino terminal part by subsequent research It was indicated that activation of a thrombin receptor takes place also by Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-Asn-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe (all amino acid is L types). Furthermore, more for example, the peptide lacking in a C terminal side became clear [ that the receptor activity ability increases ] from 14 amino acid, such as Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> and Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> (all amino acid is L types).

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Although the thrombus by which symptoms, such as myocardial infarction, cerebral infarction, lung infarction, and a peripheral artery obstructive disease, were made in the blood vessel checks a blood flow, it is considered to be the main factor to give the peripheral organization a damage and an antiplatelet drug, thrombin inhibitor, a thrombolytic drug, etc. are used for the prevention and a therapy, that all lapse into a bleeding tendency poses a problem. Although the hirudine used as thrombin inhibitor, argatroban, etc. check the enzyme activity which a thrombin has, a direct action is carried out to the acceptor of a thrombin, if it is the drugs which control the platelet agglutination of a thrombin, a coagulation operation of a thrombin will not be influenced, but a bleeding tendency is expected to be hard to fall.

[0006] Moreover, a thrombin proliferates a blood vessel smooth muscle cell through an acceptor same type, embellishing the function of a vascular endothelial cell is known, and the antagonist can be expected as effective drugs to the disease based on thromboses, such as various circulatory system diseases, for example, myocardial infarction, angina pectoris, cerebral infarction, lung infarction, peripheral artery lock out, and a postoperative thrombus.

[0007]

[Means for Solving the Problem] This invention has platelet aggregation inhibition activity, and the peptide derivative which can expect the usefulness as a circulatory system disease remedy is offered. That is, this invention is a formula (I): X-Phe-Leu-Leu-Arg-(Asn)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub> (I)

The peptide derivative expressed with (X shows among a formula the aryl carbonyl group which is not permuted [ the aralkyl carbonyl group which is not permuted / a with a carbon numbers of four or more which are not permuted / a formyl group, an acetyl group, a permutation, or / alkyl carbonyl group, a permutation, or /, a permutation, or ], the hydroxy propionyl radical which may branch, beta-alanine residue, alpha-, beta-aminoisobutyric-acid residue, or iso serine residue, and n shows 0 or 1), and its acid addition salt are offered.

[0008] Hereafter, although this invention was explained concretely, especially the amino acid that does not have a mark in this specification is L-mold, and the abridged notation used the abridged notation shown below including reagents.

Ala: Alanine beta-Ala : Beta-alanine alpha-Aib : Alpha-aminoisobutyric-acid Arg:arginine Asn: -- Asparagine Leu -- a :leucine Phe:phenylalanine Ser:serine Ise:iso serine -- Thr:threonine Boc:t-butoxycarbonyl BOP:benzotriazol-1-yloxy-tris (Dimethylamino) - FOSUFONIUMU hexafluoro phosphate DCC:N, N'-dicyclohexylcarbodiimide DIEA:diisopropyl ethylamine DMF:N,N-dimethylformamide Fmoc:9-fluorenyl methoxycarbonyl HOBt : N-hydroxy benzotriazol NMP:N-methyl pyrrolidone Pmc:2, 2, 5 and 7, the 8-pentamethyl chroman-6-sulfonyl TFA:trifluoroacetic-acid TMSBr:trimethylsilyl star's picture Trt: Trityl [0009] The peptide derivative of this invention has platelet aggregation inhibition activity, and can expect the usefulness as a circulatory system disease remedy. In this invention compound (I) as a with a carbon numbers of four or more which are not permuted [ a permutation or ] alkyl carbonyl group For example, a hydroxyl group, the amino group, a carboxyl group, a low-grade alkoxy carbonyl group, The alkyl carbonyl group of the carbon numbers 4-10 which consist of an alkyl group of the straight chain which may be permuted by a formyl group, a low-grade aliphatic series acyl group, the alkoxy group, the halogen atom, the nitro group, or the cyano group, or branched chain is mentioned. Preferably, a butyryl radical, an isobutyryl radical, a valeryl radical, an iso valeryl radical, a pivaloyl radical, a 3-hydroxy isobutyryl radical, a 2-methyl-lactoyl radical, etc. are mentioned.

[0010] As an aralkyl carbonyl group which is not permuted [ a permutation or ], the aralkyl carbonyl group which may be permuted by a hydroxyl group, the amino group, a carboxyl group, a low-grade alkoxy carbonyl group, a formyl group, a low-grade aliphatic series acyl group, the alkoxy group, the halogen atom, the nitro group, or the cyano group is mentioned, for example, and a phenylacetyl radical, a BUROMO phenylacetyl radical, a chlorophenyl acetyl group, a fluoro phenylacetyl radical, etc. are mentioned preferably.

[0011] As an aryl carbonyl group which is not permuted [ a permutation or ], the aryl carbonyl group which may be permuted by a hydroxyl-group, amino-group, carboxyl group, low-grade alkyl group, and low-grade alkoxy carbonyl group, a formyl group, a low-grade aliphatic series acyl group, the alkoxy group, the halogen atom, the nitro group, or the cyano group is mentioned, for example, and benzoyl, BUROMO benzoyl, chloro benzoyl, fluoro benzoyl, a nitrobenzoyl radical, a toluoyl radical, a naphthoyl radical, a fluoro naphthoyl radical, etc. are mentioned preferably.

[0012] As a hydroxy propionyl radical which may branch, a lactoyl radical, a 3-hydroxy propionyl radical, and a GURISE roil radical are desirable, for example.

[0013] Peptide derivative of this invention (Ia): X-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> (Ia)

It is alike and sets. Radical X Beta-alanine residue, alpha-aminoisobutyric-acid residue, Beta-aminoisobutyric-acid residue, iso serine residue, a formyl group, an acetyl group, A butyryl radical, an isobutyryl radical, a valeryl radical, an iso valeryl radical, a pivaloyl radical, A 3-hydroxy isobutyryl radical, a lactoyl radical, a 3-hydroxy propionyl radical, A GURISE roil radical, 2-methyl lactoyl radical, a phenylacetyl radical, 4-BUROMO phenylacetyl radical, 4-chlorophenyl acetyl group, 4-fluoro phenylacetyl radical, Benzoyl, 4-BUROMO benzoyl, 4-chloro benzoyl, Especially the thing that shows 4-fluoro benzoyl, 2-nitrobenzoyl radical, 3-nitrobenzoyl radical, 4-nitrobenzoyl radical, 1-naphthoyl radical, 2-naphthoyl radical, and a 4-fluoro-1-naphthoyl radical is desirable.

[0014] Moreover, peptide derivative of this invention (Ib): X-Phe-Leu-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> (Ib)

It is alike and sets. Radical X Beta-alanine residue, alpha-aminoisobutyric-acid residue, Beta-aminoisobutyric-acid residue, iso serine residue, a formyl group, an acetyl group, A butyryl radical,

an isobutyryl radical, a valeryl radical, an iso valeryl radical, a pivaloyl radical, A 3-hydroxy isobutyryl radical, a lactoyl radical, a 3-hydroxy propionyl radical, A GURISE roil radical, 2-methyl lactoyl radical, a phenylacetyl radical, 4-BUROMO phenylacetyl radical, 4-chlorophenyl acetyl group, 4-fluoro phenylacetyl radical, Benzoyl, 4-BUROMO benzoyl, 4-chloro benzoyl, Especially the thing that shows 4-fluoro benzoyl, 2-nitrobenzoyl radical, 3-nitrobenzoyl radical, 4-nitrobenzoyl radical, 1-naphthoyl radical, 2-naphthoyl radical, and a 4-fluoro-1-naphthoyl radical is desirable.

[0015] The peptide derivative of this invention can be manufactured with a standard peptide synthesis method. for example, -- as the general total writing -- "-- the [ the biochemistry experiment lecture 1, the proteinic chemistry IV, and ] -- the II section, p.207 - 495" (Tokyo Kagaku Dojin), "collaboration" (Maruzen) besides the foundation of peptide synthesis, and an experiment and Izumi store Nobuo, "development of \*\*\*\*\*", 14, Yoshio peptide synthesis and edit Okada, Yoshiaki etc. Kiso" (Hirokawa Publishing), etc. have. The H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink resin and H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Rink resin which are a start raw material are compoundable by the above mentioned general approach.

[0016] The peptide derivative of this invention introduces the radical X of said formula (I) into each peptide combined with these resin, and is obtained. What is necessary is just to carry out to installation of Radical X using a carboxylic anhydride, a compound with a carboxyl group, acid halide, or beta propiolactone. DCC/HOBt on which the compound which has a carboxyl group as a method of introducing Radical X under existence of the approach on which a carboxylic anhydride is made to act, DCC, and HOBt, for example is made to act -- the approach on which the approach on which the compound which has a carboxyl group under existence of law, a BOP reagent, and DIEA is made to act, the approach on which acid halide is made to act, or beta propiolactone is made to act is mentioned.

[0017] The carboxylic anhydride used for installation of Radical X is an anhydride of the aryl carboxylic acid which is not permuted [ the anhydride of the aralkyl carboxylic acid which is not permuted / the anhydride of the alkyl carboxylic acid of the carbon numbers 4-10 which consist of an alkyl group of the straight chain which is not permuted / a formic-acid anhydride, an acetic-acid anhydride, the lactic-acid anhydride from which the hydroxyl group was protected, the glyceric-acid anhydride from which the hydroxyl group was protected, a permutation, or /, or branched chain, a permutation or /, a permutation, or ].

[0018] As an anhydride of the alkyl carboxylic acid of the carbon numbers 4-10 which consist of an alkyl group of the straight chain which is not permuted [ a permutation or ] or branched chain For example, a hydroxyl group, the amino group, a carboxyl group, a low-grade alkoxy carbonyl group, The butanoic acid which may be permuted by a formyl group, a low-grade aliphatic series acyl group, the alkoxy group, the halogen atom, the nitro group, or the cyano group, Anhydrides, such as an isobutyric acid, a valeric acid, an isovaleric acid, and a pivalic acid, are mentioned, and anhydrides, such as butanoic acid, an isobutyric acid, a valeric acid, an isovaleric acid, a pivalic acid, 3-hydroxyisobutyric acid by which the hydroxyl group was protected, and 2-methyl lactic acid from which the hydroxyl group was protected, are mentioned preferably.

[0019] As an anhydride of the aralkyl carboxylic acid which is not permuted [ a permutation or ], the anhydride of the phenylacetic acid which may be permuted, for example by a hydroxyl group, the amino group, a carboxyl group, a low-grade alkoxy carbonyl group, a formyl group, a low-grade aliphatic series acyl group, the alkoxy group, the halogen atom, the nitro group, or the cyano group is mentioned, and anhydrides, such as a phenylacetic acid, a BUROMO phenylacetic acid, a chlorophenyl acetic acid, and a fluoro phenylacetic acid, are mentioned preferably.

[0020] As an anhydride of the aryl carboxylic acid which is not permuted [ a permutation or ], the anhydride of the benzoic acid which may be permuted, for example by a hydroxyl-group, amino-group, carboxyl group, low-grade alkyl group, and low-grade alkoxy carbonyl group, a formyl group, a low-grade aliphatic series acyl group, the alkoxy group, the halogen atom, the nitro group, or the cyano group, and a naphthoic acid is mentioned, and anhydrides, such as a benzoic acid, a BUROMO benzoic acid, a chloro benzoic acid, a fluoro benzoic acid, a nitro benzoic acid, a methyl benzoic acid a naphthoic acid, and a fluoro naphthoic acid, be mentioned preferably

[0021] The compound with the carboxyl group used for installation of Radical X is an aryl carboxylic acid which is not permuted [ the aralkyl carboxylic acid which is not permuted / the alkyl

carboxylic acid of the carbon numbers 4-10 which consist of an alkyl group of the straight chain which is not permuted the beta-alanine from which the amino group was protected, the alpha-aminoisobutyric acid, the beta-aminoisobutyric acid, an iso serine or a formic acid, an acetic acid, a lactic acid, the 3-hydroxypropionic acid by which the hydroxyl group be protected, a glyceric acid, a permutation, or /, or branched chain, a permutation or ], a permutation, or ]. As a protective group of the amino group, the compound usually used as protective groups, such as Fmoc and Boc, is used.

[0022] As an alkyl carboxylic acid of the carbon numbers 4-10 which consist of an alkyl group of the straight chain which is not permuted [ a permutation or ] or branched chain, the butanoic acid which may be permuted, for example by a hydroxyl group, the amino group, a carboxyl group, a low-grade alkoxy carbonyl group, a formyl group, a low-grade aliphatic series acyl group, the alkoxy group, the halogen atom, the nitro group, or the cyano group, an isobutyric acid, a valeric acid, an isovaleric acid, a pivalic acid, etc. be mentioned, and butanoic acid, an isobutyric acid, a valeric acid, an isovaleric acid, a pivalic acid, 3-hydroxyisobutyric acid, 2-methyl lactic acid, etc. be mentioned preferably.

[0023] As an aralkyl carboxylic acid which is not permuted [ a permutation or ], the phenylacetic acid which may be permuted, for example by a hydroxyl group, the amino group, a carboxyl group, a low-grade alkoxy carbonyl group, a formyl group, a low-grade aliphatic series acyl group, the alkoxy group, the halogen atom, the nitro group, or the cyano group is mentioned, and a phenylacetic acid, a BUROMO phenylacetic acid, a chlorophenyl acetic acid, a fluoro phenylacetic acid, etc. are mentioned preferably.

[0024] As an aryl carboxylic acid which is not permuted [ a permutation or ], the benzoic acid and naphthoic acid which may be permuted, for example by a hydroxyl-group, amino-group, carboxyl group, low-grade alkyl group, and low-grade alkoxy carbonyl group, a formyl group, a low-grade aliphatic series acyl group, the alkoxy group, the halogen atom, the nitro group, or the cyano group are mentioned, and a benzoic acid, a BUROMO benzoic acid, a chloro benzoic acid, a fluoro benzoic acid, a nitro benzoic acid, a methyl benzoic acid, a naphthoic acid, a fluoro naphthoic acid, etc. are mentioned preferably.

[0025] The acid halide used for installation of Radical X is a halogenide of the aryl carboxylic acid which is not permuted [ the halogenide of the aralkyl carboxylic acid which is not permuted / the halogenide of the alkyl carboxylic acid of the carbon numbers 4-10 which consist of an alkyl group of the straight chain which is not permuted / formic-acid halogenide, an acetic-acid halogenide, the lactic-acid halogenide by which the hydroxyl group was protected, the 3-hydroxypropionic-acid halogenide by which the hydroxyl group was protected the glyceric-acid halogenide by which the hydroxyl group be protected, a permutation, or /, or branched chain, a permutation or /, a permutation, or ].

[0026] As a halogenide of the alkyl carboxylic acid of the carbon numbers 4-10 which consist of an alkyl group of the straight chain which is not permuted [ a permutation or ] or branched chain For example, a hydroxyl group, the amino group, a carboxyl group, a low-grade alkoxy carbonyl group, The butanoic acid which may be permuted by a formyl group, a low-grade aliphatic series acyl group, the alkoxy group, the halogen atom, the nitro group, or the cyano group, Halogenides, such as an isobutyric acid, a valeric acid, an isovaleric acid, and a pivalic acid, are mentioned, and butyryl chloride, isobutyryl chloride, valeryl chloride, iso valeryl chloride, pivaloyl chloride, etc. are mentioned preferably.

[0027] As a halogenide of the aralkyl carboxylic acid which is not permuted [ a permutation or ], the halogenide of the phenylacetic acid which may be permuted, for example by a hydroxyl group, the amino group, a carboxyl group, a low-grade alkoxy carbonyl group, a formyl group, a low-grade aliphatic series acyl group, the alkoxy group, the halogen atom, the nitro group, or the cyano group is mentioned, and 4-chlorophenyl acetyl chloride, 4-BUROMO phenylacetyl chloride, 4-fluoro phenylacetyl chloride, etc. are mentioned preferably.

[0028] As a halogenide of the aryl carboxylic acid which is not permuted [ a permutation or ] For example, a hydroxyl-group, amino-group, carboxyl group, low-grade alkyl group, and low-grade alkoxy carbonyl group, The halogenide of the benzoic acid which may be permuted by a formyl group, a low-grade aliphatic series acyl group, the alkoxy group, the halogen atom, the nitro group, or the cyano group, and a naphthoic acid is mentioned. Preferably 4-BUROMO benzoyl chloride, 4-

chloro benzoyl chloride, 4-fluoro benzoyl chloride, 2-nitrobenzoyl chloride, 3-nitrobenzoyl chloride, 4-nitrobenzoyl chloride, 1-naphthoyl chloride, 2-naphthoyl chloride, 4-fluoro-1-naphthoyl chloride, etc. are mentioned.

[0029] The reaction for which a carboxylic anhydride is made to act on H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink resin or H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Rink resin CH<sub>2</sub> -- the peptide combined with said resin carried out among solvents, such as Cl<sub>2</sub>, DMF, and N-methyl pyrrolidone, -- receiving -- 100 mol % [ of carboxylic anhydrides ] - 800-mol % -- preferably It is 200-mol % - 400-mol %, and the range of 10 degrees C - 28 degrees C of reaction temperature is usually 15 degrees C - 28 degrees C preferably, and a reaction is performed preferably for 2 hours to 48 hours for 2 hours to 72 hours.

[0030] The reaction on which the compound which has a carboxyl group in H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink resin or H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Rink resin under existence of DCC and HOBt is made to act Dimethylformamide, 100 mol % [ which has a carboxyl group to the peptide combined with said resin carried out among solvents, such as N-methyl pyrrolidone / of compounds ] - 800-mol % -- preferably 200-mol % - 400-mol % -- DCC 100-mol % - 800-mol % -- preferably 200-mol % - 400-mol % -- HOBt 100 mol % - 800-mol % -- preferably It is 200-mol % - 400-mol %, and the range of 10 degrees C - 28 degrees C of reaction temperature is usually 15 degrees C - 28 degrees C preferably, and a reaction is performed preferably for 2 hours to 48 hours for 2 hours to 72 hours.

[0031] The reaction on which the compound which has a carboxyl group in H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink resin or H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Rink resin under existence of a BOP reagent and DIEA is made to act 100 mol % [ which has a carboxyl group to the peptide combined with said resin carried out among solvents, such as dimethylformamide and N-methyl pyrrolidone, / of compounds ] - 800-mol % -- preferably 200-mol % - 400-mol % -- 100 mol % [ of BOP reagents ] - 800-mol % -- preferably 200-mol % - 400-mol % -- it is -- DIEA 100-mol % - 800-mol % -- preferably It is 200-mol % - 400-mol %, and the range of 10 degrees C - 28 degrees C of reaction temperature is usually 15 degrees C - 28 degrees C preferably, and a reaction is performed preferably for 2 hours to 48 hours for 2 hours to 72 hours.

[0032] The reaction for which acid halide is made to act on H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink resin or H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Rink resin CH<sub>2</sub> -- the peptide combined with said resin carried out among solvents, such as Cl<sub>2</sub>, DMF, and N-methyl pyrrolidone, -- receiving -- 100 mol % [ of acid halides ] - 400-mol % -- preferably It is 100-mol % - 200-mol %, and the range of 10 degrees C - 28 degrees C of reaction temperature is usually 15 degrees C - 28 degrees C preferably, and a reaction is performed preferably for 2 hours to 48 hours for 2 hours to 72 hours.

[0033] The reaction for which beta propiolactone is made to act on H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink resin or H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Rink resin CH<sub>2</sub> -- the peptide combined with said resin carried out among solvents, such as Cl<sub>2</sub>, DMF, and N-methyl pyrrolidone, -- receiving -- beta propiolactone 100-mol % - 800-mol % -- preferably It is 100-mol % - 400-mol %, and the range of 10 degrees C - 28 degrees C of reaction temperature is usually 15 degrees C - 28 degrees C preferably, and a reaction is performed preferably for 48 hours to 72 hours for 24 hours to 72 hours.

[0034] After agitating and carrying out deprotection in the mixed solution of thioanisole:ethane dithiol:m-cresol:TFA:TMSBr, the obtained peptide derivative removes resin, condenses a solution, and is usually obtained as precipitation by adding the ether. It is refined by the gradient elution to which the CH<sub>3</sub>CN concentration of the CH<sub>3</sub>CN solution which carries out a load to an opposition ODS column, and contains 1% of TFA is changed from 6% to 60% after dissolving the obtained rough peptide in water or 30% acetic-acid water solution.

[0035] The high speed liquid chromatography for analysis (HPLC for analysis) performed purity assay of the peptide derivative of this invention, and the structure of each peptide derivative was checked by the FAB-mass spectrometer (FAB-MS). The peptide derivative of this invention showed 97% or more of purity on the high-speed liquid chromatograph, and its data of FAB-MS of each peptide derivative also corresponded with the theoretical value. Moreover, the holding time (Rt) in HPLC for analysis of each peptide derivative was shown in the example.

The condition device of HPLC for analysis: Shimazu LC-6A System column: YMC-Pack A-302 ODS 4.6phix150mm expansion solvent: Linear gradient during 30 minutes from 8%CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA to 80%CH<sub>3</sub>CN/0.1%TFA [0036]



[Example] Although an example explains this invention further below at a detail, this invention is not limited to this example.

[0037] Example [ of Reference ] 1: Peptide-Rink resin was built by the Fmoc mold solid phase technique using construction peptide synthesizer 430A (product made from Applied Biosystems) of H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink resin. Namely, Rink resin Mark resin was built by the program which carries out sequential condensation of Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, and Fmoc-Phe-OH, and carries out deprotection of the Fmoc radical in the last cycle by the DCC/HOBt/NMP method from 596mg (0.25mmol).

[0038] Example [ of Reference ] 2: Peptide-Rink resin was built by the Fmoc mold solid phase technique using construction peptide synthesizer 430A (product made from Applied Biosystems) of H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Rink resin. Namely, Rink resin Mark resin was built by the program which carries out sequential condensation of Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, and Fmoc-Phe-OH, and carries out deprotection of the Fmoc radical in the last cycle by the DCC/HOBt/NMP method from 676mg (0.25mmol).

[0039] Example 1: H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink resin built using the approach of the example 1 of synthetic reference of H-beta-Ala-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> and 2TFA(1) It is DMF about 387mg (0.125mmol). It suspends in 7ml and is Fmoc-beta-Ala-OH. 156mg (0.5mmol), HOBt 68mg (0.5mmol), DCC 103mg (0.5mmol) In addition, it shook for two days. They are after washing, and 10% piperazine / DMF solution at DMF and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> about the obtained resin. 10ml was added and it shook for 20 minutes. Furthermore, resin was dried after washing by DMF and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. It is thioanisole in 380mg (0.125mmol) of obtained resin. 1.17ml, ethane dithiol 0.585ml, m-cresol 0.2ml, TFA 7.48ml, TMSBr Resin was removed and the solution was condensed, after agitating and carrying out deprotection in a 1.35ml mixed solution. The ether was added to concentration liquid and the peptide was settled. The obtained rough peptide is dissolved in water and it is YMC pack DOKARAMU. The load was carried out to ODS-5 (20phix250mm), and it refined (in TFA and the buffer solution B, 60%CH<sub>3</sub>CN in which the buffer solution A contains TFA 0.1% 0.1%, and the rate of flow changed CH<sub>3</sub>CN concentration by 10 ml/min, and the gradient was changed in 60 minutes from 6% to 60%). The fraction containing the purpose peptide is freeze-dried and it is a mark peptide derivative (1). 95.3mg was obtained.

FAB-MS: 732 [M+H]<sup>+</sup>Rt:12.14min [0040] Example 2: H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink resin built using the approach of the example 1 of synthetic reference of H-alpha-Aib-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> and 2TFA(2) It is DMF about 435mg (0.125mmol). It suspends in 7ml and is Boc-alpha-Aib-OH. 204mg (1mmol), HOBt 136mg (1mmol), DCC 206mg (1mmol) was added and it shook for two days. The obtained resin was dried after washing by DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and MeOH. Deprotection and purification are performed like an example 1 and it is a mark peptide derivative (2). 63.4mg was obtained.

FAB-MS: 746 [M+H]<sup>+</sup>Rt:12.24min [0041] Example 3: H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink resin built using the approach of the example 1 of synthetic reference of H-DL-Ise-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> and 2TFA(3) It is DMF about 914mg (0.25mmol). It suspends in 10ml and is Fmoc-DL-Ise-OH. 409mg (1.25mmol), BOP reagent 553mg (1.25mmol), DIEA 218microl (1.25mmol) was added and it shook for seven days. The obtained resin was filtered, and it shook for 20 minutes in 10% piperazine / DMF solution after washing by DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and MeOH, and dried after washing by DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and MeOH. Deprotection and purification are performed like an example 1 and it is a mark peptide derivative (3). 54.4mg was obtained.

FAB-MS: 748 [M+H]<sup>+</sup>Rt:11.93min [0042] Example 4: H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink resin built using the approach of HCO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> and the example 1 of synthetic reference of TFA (4) It is DMF about 435mg (0.125mmol). It suspends in 7ml and is a formic acid. They are 1 (1mmol) and DCC 38micro. 206mg (1mmol), pyridine 82microl (1mmol) was added and it shook for two days. The obtained resin was filtered and it dried after washing by DMF and MeOH. Deprotection and purification are performed like an example 1 and it is a mark peptide derivative (4). 33.0mg was obtained.

FAB-MS: 689 [M+H]<sup>+</sup>Rt:14.15min [0043] Example 5: CH<sub>3</sub> CO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub>, TFA (5) H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink resin built using the approach of the example 1 of synthetic reference It is DMF about 435mg (0.125mmol). It suspends in 7ml and is an acetic



anhydride. 47microl (0.5mmol) and pyridine 41microl (0.5mmol) were added, and it shook for one day. The obtained resin was filtered and it dried after washing by DMF and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Deprotection and purification are performed like an example 1 and it is a mark peptide derivative (5). 80.0mg was obtained.

FAB-MS: 703 [M+H]<sup>+</sup>Rt:14.70min [0044] Example 6: H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink resin built using the approach of n-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> CO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> and the example 1 of synthetic reference of TFA (6) It is DMF about 404mg (0.125mmol). It suspends in 7ml and is 2 (n-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO) O. 82microl (0.5mmol), pyridine 41microl (0.5mmol) was added and it shook for two days. The obtained resin was filtered and it dried after washing by DMF and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Deprotection and purification are performed like an example 1 and it is a mark peptide derivative (6). 84.4mg was obtained.

FAB-MS: 731 [M+H]<sup>+</sup>Rt:16.90min [0045] Example 7: (CH<sub>3</sub>) H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink resin built using the approach of 2 CHCO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> and the example 1 of synthetic reference of TFA (7) It is DMF about 404mg (0.125mmol). It suspends in 7ml and is [(CH<sub>3</sub>) 2CHCO]2O. 82microl (0.5mmol), pyridine 41microl (0.5mmol) was added and it shook for one day. The obtained resin was filtered and it dried after washing by DMF and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Deprotection and purification are performed like an example 1 and it is a mark peptide derivative (7). 92.8mg was obtained.

FAB-MS: 731 [M+H]<sup>+</sup>Rt:16.92min [0046] Example 8: (CH<sub>3</sub>) H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Rink resin built using the approach of 2 CHCO-Phe-Leu-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> and the example 2 of synthetic reference of TFA (8) It is DMF about 445mg (0.125mmol). It suspends in 7ml and is [(CH<sub>3</sub>) 2CHCO]2O. 83microl (0.5mmol) and pyridine 41microl (0.5mmol) were added, and it shook for 3 hours. The obtained resin was filtered and it dried after washing by DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and MeOH. Deprotection and purification are performed like an example 1 and it is a mark peptide derivative (8). 58.0mg was obtained.

FAB-MS: 617 [M+H]<sup>+</sup>Rt:17.56min [0047] Example 9: (CH<sub>3</sub>) H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink resin built using the approach of 3 CCO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> and the example 1 of synthetic reference of TFA (9) It is DMF about 435mg (0.125mmol). It suspends in 7ml and is 3 (CH<sub>3</sub>) CCOOH. 51mg (0.5mmol), HOBT 68mg (0.5mmol), DCC 103mg (0.5mmol) was added and it shook for one day. The obtained resin was filtered and it dried after washing by DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and MeOH. Deprotection and purification are performed like an example 1 and it is a mark peptide derivative (9). 60.0mg was obtained.

FAB-MS: 745 [M+H]<sup>+</sup>Rt:18.26min [0048] Example 10: H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink resin built using the approach of HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> CO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> and the example 1 of synthetic reference of TFA (10) It is DMF about 415mg (0.125mmol). It suspends in 5ml and is beta propiolactone. 63microl (1mmol) was added and it shook for two days. The obtained resin was filtered and it dried after washing by DMF and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Deprotection and purification were performed like the example 1 and mark peptide derivative (10) 26.0mg was obtained.

FAB-MS: 733 [M+H]<sup>+</sup>Rt:11.62min [0049] Example 11: H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink resin built using the approach of L-Lactovl-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> and the example 1 of synthetic reference of TFA (11) It is DMF about 458mg (0.25mmol). It suspends in 7ml and is (+)-L-lactic acid. 90mg (1mmol), BOP reagent 442mg (1mmol), DIEA 274microl (1.575mmol) was added and it shook for 5 hours. The obtained resin was filtered and it dried after washing by DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and MeOH. Deprotection and purification are performed like an example 1 and it is a mark peptide derivative (11). 64.8mg was obtained.

FAB-MS: 733 [M+H]<sup>+</sup>Rt:14.37min [0050] H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink resin built using the approach of Example 12: Benzovl-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> and the example 1 of synthetic reference of TFA (12) 408mg (0.125mmol) -- DMF 7ml -- suspending -- benzoic acid 61mg (0.5mmol) and HOBT68 -- mg (0.5mmol) and DCC 103mg (0.5mmol) In addition, it shook for one day. The obtained resin was dried after washing by DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and MeOH. Deprotection and purification were performed like the example 1 and mark peptide derivative (12) 21.0mg was obtained.

FAB-MS: 765 [M+H]<sup>+</sup>Rt:18.23min [0051] example 13 :P H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink resin built using the approach of the example 1 of synthetic reference of henvlacetvl-Phe-Leu-Leu-

Arg-Asn-NH<sub>2</sub> and TFA (13) It is DMF about 327mg (0.125mmol). It suspends in 7ml and is a phenylacetic acid. 68mg (0.5mmol), HOBt 68mg (0.5mmol), DCC 103mg (0.5mmol) In addition, it shook for one day. The obtained resin was filtered and it dried after washing by DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and MeOH. Deprotection and purification are performed like an example 1 and it is a mark peptide derivative (13). 41.0mg was obtained.



FAB-MS: 779 [M+H]<sup>+</sup>Rt:18.58min [0052] Example 14: H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink resin built using the approach of p-Bromobenzoyl-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> and the example 1 of synthetic reference of TFA (14) It is 4-BUROMO benzoyl chloride about 362mg (0.125mmol). The resin obtained after the PARABUROMO benzoilation was filtered by 330mg (1.50mmol), and it dried after washing by DMF and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Deprotection and purification were performed like the example 1 and title peptide derivative (14) 55mg was obtained.

FAB-MS: 843, 845 [M+H]<sup>+</sup>Rt:19.57min [0053] Example of a trial About the peptide derivative in which platelet agglutination carried out measurement composition, platelet agglutination was measured and the result was shown in the 1st table (EC<sub>50</sub> showed front Naka and platelet aggregation activity, and IC<sub>50</sub> showed platelet aggregation inhibition activity).

[0054]

[Table 1]

第 1 表

実施例番号	化合物番号	試験化合物	EC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
2	2	H-α-Aib-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH <sub>2</sub>	332.98 ± 113.08	47.65 ± 14.58
4	4	HCO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH <sub>2</sub>	62.38 ± 11.04	8.61 ± 3.30
5	5	CH <sub>3</sub> CO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH <sub>2</sub>	84.52 ± 4.56	7.51 ± 1.54
6	6	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH <sub>2</sub>	75.11 ± 3.58	14.94 ± 2.89
7	7	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH <sub>2</sub>	>100	39.38 ± 10.67
1 1	1 1	L-Lactoyl-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH <sub>2</sub>	49.02 ± 8.98	3.53 ± 0.63
1 2	1 2	 -CO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH <sub>2</sub>	>300	60.1 ± 8.6
1 4	1 4	Br-  -CO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH <sub>2</sub>	>300	86.8

[0055] (Approach) Healthy human blood liquid was used. Blood collecting performed 3.13% sodium citrate which carried out silicon coating with 1 / 10 capacity \*\*\*\* vacuum blood collecting tubing. Platelet rich plasma (PRP) was prepared by carrying out centrifugal separation (for 120xg and 20 minutes) of the blood. Thrombin receptor agonist peptide; platelet agglutination was measured with the nephelometry of Born, using H-Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> (last concentration 1microM or 2microM) as a platelet aggregation inducement medicine. The test drug was dissolved and used for distilled water or dimethyl sulfoxide (DMSO). When a test drug was water solubility, 20microl addition of a test drug was done at 210micro of solutions 1 which added the calcium chloride to PRP (last concentration 1mM), 20microl addition of a condensation inducement medicine solution was done after 5 minutes, and platelet agglutination was measured (total amount 250microl). When a test drug was lipophilicity, 2microl addition of a test drug was done at 228micro of solutions 1 which added the calcium chloride to PRP (last concentration 1mM), 20microl addition of a condensation inducement medicine solution was done after 5 minutes, and platelet agglutination was measured (total amount 250microl).

[0056]

[Effect of the Invention] The peptide derivative of this invention has platelet aggregation inhibition activity, and can expect the usefulness as a circulatory system disease remedy.

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] Formula (I): X-Phe-Leu-Leu-Arg-(Asn) n-NH<sub>2</sub> (I)

They are the peptide derivative expressed with (X shows among a formula the aryl carbonyl group which is not permuted [ the aralkyl carbonyl group which is not permuted / a with a carbon numbers of four or more which are not permuted / a formyl group, an acetyl group, a permutation, or / alkyl carbonyl group, a permutation, or /, a permutation, or ], the hydroxy propionyl radical which may branch, beta-alanine residue, alpha-, beta-aminoisobutyric-acid residue, or iso serine residue, and n shows 0 or 1), and its acid addition salt.

---

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-101984

(43) 公開日 平成7年(1995)4月18日

(51) Int. CL <sup>6</sup>	識別記号	片内整理番号	P I	技術表示箇所
C 0 7 K 5/107	Z N A	8318-4H		
7/02		8318-4H1		
7/06		8318-4H		
			A 6 1 K 37/ 02	ABN
				ACB
			審査請求 未請求 請求項の数1 書面 (全 9 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願平5-277294	(71) 出願人	000001904 サントリー株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
(22) 出願日	平成5年(1993)9月30日	(72) 発明者	北島 安雄 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社生物医学研究所内
		(72) 発明者	島本 哲男 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社生物医学研究所内
		(72) 発明者	石黒 正路 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社生物医学研究所内

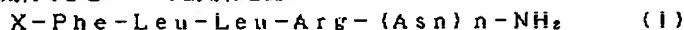
(54) 【発明の名称】 ペプチド誘導体

(57) 【要約】

【目的】 血小板凝集阻害活性があり、循環器系疾患  
治療薬としての有用性が期待できるペプチド誘導体を提\*

\* 供する。

【構成】 式(i) :



(式中、Xはホルミル基、アセチル基、置換もしくは無置換の炭素数4以上のアルキルカルボニル基、置換もしくは無置換のアラルキルカルボニル基、置換もしくは無置換のアリールカルボニル基、分岐していてもよいヒド

ロキシプロピオニル基、β-アラニン残基、α-もしくはβ-アミノイソ酪酸残基またはイソセリン残基を示し、nは0または1を示す)で表されるペプチド誘導体およびその酸付加塩。

(2)

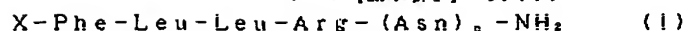
特開平7-101984

1

2

【特許請求の範囲】

\* \* 【請求項1】 式(1)：



(式中、Xはホルミル基、アセチル基、置換もしくは無置換の炭素数4以上のアルキルカルボニル基、置換もしくは無置換のアラルキルカルボニル基、置換もしくは無置換のアリールカルボニル基、分岐していてもよいヒドロキシプロピオニル基、β-アラニン残基、α-もしくはβ-アミノイソ酪酸残基またはイソセリン残基を示し、nは0または1を示す)で表されるペプチド誘導体およびその鹽付加塩。

【発明の詳細な説明】

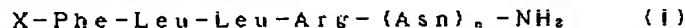
【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、血小板凝集を阻害するペプチド誘導体に関する。さらに詳しくは、新規なトロンビンレセプター拮抗ペプチド誘導体に関する。

【0002】

【従来の技術】トロンビンは、血液の凝固系に関与し、最終段階においてフィブリノーゲンをフィブリンに変え、血液を凝固させる。その他にも血小板凝集作用、血管平滑筋細胞増殖作用、血管内皮細胞増殖作用をもつことが知られている。血液の凝固系においては、トロンビンの役割が詳細に研究され、血液凝固のカスケードも明らかにされている。

【0003】一方、トロンビンの血小板凝集作用、血管平滑筋細胞増殖作用、血管内皮細胞増殖作用の発現機構については、不明であった。ところが最近になって、トロンビンによって活性化されるレセプターの構造が、Damian細胞からとれたmRNAに対するcDNAの解析から明らかになった(Cell, 64 (1991) p. 1057-1068)。また、血小板に対するトロンビンの作用についても明らかになった(Nature, 353 (1991) p. 674-677)。それによると、トロンビンによって活性化されるレセプターは、トロンビンレセプターと呼ばれるいわゆるG蛋白共役レセプターであり、トロンビンは、トロンビンレセプターの血小板細胞膜の外側に出ているポリペプチド部分のN末端側の1ヶ所を切断する。その切断によって新しく生じたN末端部分のペプチドがレセプター自身に結合し、シグナルトランスダクションが起こることが明らか※



(式中、Xはホルミル基、アセチル基、置換もしくは無置換の炭素数4以上のアルキルカルボニル基、置換もしくは無置換のアラルキルカルボニル基、置換もしくは無置換のアリールカルボニル基、分岐していてもよいヒドロキシプロピオニル基、β-アラニン残基、α-もしくはβ-アミノイソ酪酸残基またはイソセリン残基を示し、nは0または1を示す)で表されるペプチド誘導体およびその鹽付加塩を提供するものである。

【0008】以下、本発明について具体的に説明するが、本明細書において、特に標記のないアミノ酸はL-

※にされた。

【0004】また、その後の研究によって、このN末端部分に相当するアミノ酸14ヶからなるペプチド Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-Asn-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe (アミノ酸はすべてL型である)でもトロンビンレセプターの活性化が起こることが開示された。さらに、例えば、Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub>、Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> (アミノ酸はすべてL型である)など、アミノ酸14ヶからC末端側を欠いたペプチドほどそのレセプター活性が増加することが明らかとなった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】心筋梗塞、脳梗塞、肺梗塞、末梢動脈閉塞性疾患などの病態は、血管内にできた血栓が血流を阻害し、その末梢組織にダメージを与えることが主因であると考えられており、その予防と治療のために血小板凝集阻害薬、トロンビン阻害薬、血栓溶解薬などが使用されているが、いずれも出血傾向に陥ることが問題となっている。トロンビン阻害薬として用いられるヒルジンやアルガトロバンなどはトロンビンが有する酵素活性を阻害するものであるが、トロンビンの受容体に直接作用し、トロンビンの血小板凝集作用を抑制する薬剤であれば、トロンビンの凝固作用には影響せず、出血傾向には陥りにくいことが期待される。

【0006】また、トロンビンは同じタイプの受容体を介して血管平滑筋細胞を増殖させ、血管内皮細胞の機能を修飾することが知られており、その拮抗剤は各種循環器系疾患、例えば心筋梗塞、狭心症、脳梗塞、肺梗塞、末梢動脈閉塞、術後血栓などの血栓形成に基づく疾患に対して有効である医薬品として期待できる。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、血小板凝集阻害活性があり、循環器系疾患治療薬としての有用性が期待できるペプチド誘導体を提供するものである。すなわち、本発明は式(1)：

型であり、略記号は試薬類を含め下に示される略記号を用いた。

Ala：アラニン

β-Ala：β-アラニン

α-Alb：α-アミノイソ酪酸

Arg：アルギニン

Asn：アスパラギン

Leu：ロイシン

Phe：フェニルアラニン

Ser：セリン

(3)

特開平7-101984

3

4

Ise: イソセリン

Thr: トレオニン

Boc: t-ブトキシカルボニル

BOP: ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリ  
ス(ジメチルアミノ)-フォスホニウムヘキサフルオ  
ロフォスフェート

DCC: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

DIEA: ジイソプロピルエチルアミン

DMF: N, N-ジメチルホルムアミド

Fmoc: 9-フルオレニルメトキシカルボニル

HOBt: N-ヒドロキシベンゾトリアゾール

NMP: N-メチルピロリドン

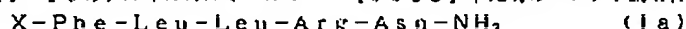
Pmc: 2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-  
6-スルホニル

TFA: トリフルオロ酢酸

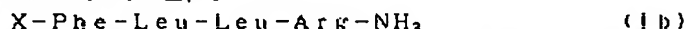
TMSBr: トリメチルシリルブロマイド

Trt: トリチル

【0009】本発明のペプチド誘導体は、血小板凝集阻  
害活性があり、循環器疾患治療薬としての有用性が期  
待できる。本発明化合物(1)において、置換もしくは  
無置換の炭素数4以上のアルキルカルボニル基として  
は、例えば、水酸基、アミノ基、カルボキシル基、低級  
アルコキシカルボニル基、ホルミル基、低級脂肪酸ア  
シル基、アルコキシ基、ハロゲン原子、ニトロ基またはシ  
アノ基で置換されていてもよい直鎖ないしは分岐鎖のアル  
キル基からなる炭素数4~10のアルキルカルボニル基



においては、基Xが、β-アラニン残基、α-アミノイ  
ソ酪酸残基、β-アミノイソ酪酸残基、イソセリン残  
基、ホルミル基、アセチル基、ブチリル基、イソブチリ  
ル基、バレリル基、イソバレリル基、ビバロイル基、3-  
ヒドロキシイソブチリル基、ラクティル基、3-ヒド  
ロキシプロピオニル基、グリセロイル基、2-メチルラ  
クティル基、フェニルアセチル基、4-プロモフェニル  
アセチル基、4-クロロフェニルアセチル基、4-フル※



においては、基Xが、β-アラニン残基、α-アミノイ  
ソ酪酸残基、β-アミノイソ酪酸残基、イソセリン残  
基、ホルミル基、アセチル基、ブチリル基、イソブチリ  
ル基、バレリル基、イソバレリル基、ビバロイル基、3-  
ヒドロキシイソブチリル基、ラクティル基、3-ヒド  
ロキシプロピオニル基、グリセロイル基、2-メチルラ  
クティル基、フェニルアセチル基、4-プロモフェニル  
アセチル基、4-クロロフェニルアセチル基、4-フル  
オロフェニルアセチル基、ベンゾイル基、4-プロモベン  
ゾイル基、4-クロロベンゾイル基、4-フルオロベン  
ゾイル基、2-ニトロベンゾイル基、3-ニトロベン  
ゾイル基、4-ニトロベンゾイル基、1-ナフトイル  
基、2-ナフトイル基、4-フルオロ-1-ナフトイル  
基を示すものが特に好ましい。

\*基が挙げられ、好ましくは、ブチリル基、イソブチリ  
ル基、バレリル基、イソバレリル基、ビバロイル基、3-  
ヒドロキシイソブチリル基、2-メチルラクティル基  
などが挙げられる。

【0010】置換もしくは無置換のアラルキルカルボニ  
ル基としては、例えば、水酸基、アミノ基、カルボキシ  
ル基、低級アルコキシカルボニル基、ホルミル基、低級  
脂肪酸アシル基、アルコキシ基、ハロゲン原子、ニトロ  
基またはシアノ基で置換されていてもよいアラルキルカ  
ルボニル基が挙げられ、好ましくは、フェニルアセチ  
ル基、プロモフェニルアセチル基、クロロフェニルアセ  
チル基、フルオロフェニルアセチル基などが挙げられる。

【0011】置換もしくは無置換のアリールカルボニル  
基としては、例えば、水酸基、アミノ基、カルボキシ  
ル基、低級アルキル基、低級アルコキシカルボニル基、ホ  
ルミル基、低級脂肪酸アシル基、アルコキシ基、ハロゲ  
ン原子、ニトロ基またはシアノ基で置換されていてもよ  
いアリールカルボニル基が挙げられ、好ましくは、ベン  
ゾイル基、プロモベンゾイル基、クロロベンゾイル基、  
フルオロベンゾイル基、ニトロベンゾイル基、トルオイ  
ル基、ナフトイル基、フルオロナフトイル基などが挙げ  
られる。

【0012】分岐していてもよいヒドロキシプロピオニ  
ル基としては、例えば、ラクティル基、3-ヒドロキシ  
プロピオニル基、グリセロイル基が好ましい。

【0013】本発明のペプチド誘導体(1a):

※オロフェニルアセチル基、ベンゾイル基、4-プロモベン  
ゾイル基、4-クロロベンゾイル基、4-フルオロベン  
ゾイル基、2-ニトロベンゾイル基、3-ニトロベン  
ゾイル基、4-ニトロベンゾイル基、1-ナフトイル  
基、2-ナフトイル基、4-フルオロ-1-ナフトイル  
基を示すものが特に好ましい。

【0014】また、本発明のペプチド誘導体(1b):

【0015】本発明のペプチド誘導体は、標準的なペプ  
チド合成法によって製造できる。例えば、一般的な総合  
として「生化学実験講座1、タンパク質の化学IV、第  
11部、p. 207~495」(東京化学同人)、「ペ  
プチド合成の基礎と実験・泉屋信夫他共著」(丸善)、  
「純医薬品の開発、14、ペプチド合成・編集岡田芳  
男、木曾良明」(廣川書店)などがある。出発原料であ  
るH-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink樹脂およびH-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Rink樹脂は、前記  
した一般的方法によって合成できる。

【0016】本発明のペプチド誘導体は、これら樹脂に  
結合した各ペプチドに、前記式(1)の基Xを導入して  
得られる。基Xの導入には、カルボン酸無水物、カルボ

(4)

特開平7-101984

5

6

キシル基をもつ化合物、酸ハロゲン化物または $\beta$ -プロピオラクトンを用いて行えばよい。基Xの導入法としては、例えば、カルボン酸無水物を作用させる方法、DCCおよびHOBtの存在下でカルボキシル基をもつ化合物を作用させるDCC/HOBt法、BOP試薬およびDIEAの存在下でカルボキシル基をもつ化合物を作用させる方法、酸ハロゲン化物を作用させる方法または $\beta$ -プロピオラクトンを作用させる方法が挙げられる。

【0017】基Xの導入に用いるカルボン酸無水物とは、キ酸無水物、酢酸無水物、水酸基が保護された乳酸無水物、水酸基が保護されたグリセリン酸無水物、置換もしくは無置換の直鎖ないしは分岐鎖のアルキル基からなる炭素数4～10のアルキルカルボン酸の無水物、置換もしくは無置換のアラルキルカルボン酸の無水物、置換もしくは無置換のアリールカルボン酸の無水物である。

【0018】置換もしくは無置換の直鎖ないしは分岐鎖のアルキル基からなる炭素数4～10のアルキルカルボン酸の無水物としては、例えば水酸基、アミノ基、カルボキシル基、低級アルコキシカルボニル基、ホルミル基、低級脂肪酸アシル基、アルコキシ基、ハロゲン原子、ニトロ基またはシアノ基で置換されていてもよい酪酸、イソ酪酸、吉草酸、イソ吉草酸、ピバル酸などの無水物が挙げられ、好ましくは、酪酸、イソ酪酸、吉草酸、イソ吉草酸、ピバル酸、水酸基が保護された3-ヒドロキシイソ酪酸、水酸基が保護された2-メチル乳酸などの無水物が挙げられる。

【0019】置換もしくは無置換のアラルキルカルボン酸の無水物としては、例えば水酸基、アミノ基、カルボキシル基、低級アルコキシカルボニル基、ホルミル基、低級脂肪酸アシル基、アルコキシ基、ハロゲン原子、ニトロ基またはシアノ基で置換されていてもよいフェニル酢酸、プロモフェニル酢酸、クロロフェニル酢酸、フルオロフェニル酢酸などの無水物が挙げられる。

【0020】置換もしくは無置換のアリールカルボン酸の無水物としては、例えば水酸基、アミノ基、カルボキシル基、低級アルキル基、低級アルコキシカルボニル基、ホルミル基、低級脂肪酸アシル基、アルコキシ基、ハロゲン原子、ニトロ基またはシアノ基で置換されていてもよい安息香酸、ナフトエ酸の無水物が挙げられ、好ましくは、安息香酸、プロモ安息香酸、クロロ安息香酸、フルオロ安息香酸、ニトロ安息香酸、メチル安息香酸、ナフトエ酸、フルオロナフトエ酸などの無水物が挙げられる。

【0021】基Xの導入に用いるカルボキシル基をもつ化合物とは、アミノ基が保護された $\beta$ -アラニン、 $\alpha$ -アミノイソ酪酸、 $\beta$ -アミノイソ酪酸、イソセリン、または、キ酸、酢酸、乳酸、水酸基が保護された3-ヒドロキシプロピオン酸、グリセリン酸、置換もしくは無置換

の直鎖ないしは分岐鎖のアルキル基からなる炭素数4～10のアルキルカルボン酸、置換もしくは無置換のアラルキルカルボン酸、置換もしくは無置換のアリールカルボン酸である。アミノ基の保護基としては、Fmoc、Bocなど保護基として通常使用される化合物が用いられる。

【0022】置換もしくは無置換の直鎖ないしは分岐鎖のアルキル基からなる炭素数4～10のアルキルカルボン酸としては、例えば水酸基、アミノ基、カルボキシル基、低級アルコキシカルボニル基、ホルミル基、低級脂肪酸アシル基、アルコキシ基、ハロゲン原子、ニトロ基またはシアノ基で置換されていてもよい酪酸、イソ酪酸、吉草酸、イソ吉草酸、ピバル酸などが挙げられ、好ましくは、酪酸、イソ酪酸、吉草酸、イソ吉草酸、ピバル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸、2-メチル乳酸などが挙げられる。

【0023】置換もしくは無置換のアラルキルカルボン酸としては、例えば水酸基、アミノ基、カルボキシル基、低級アルコキシカルボニル基、ホルミル基、低級脂肪酸アシル基、アルコキシ基、ハロゲン原子、ニトロ基またはシアノ基で置換されていてもよいフェニル酢酸が挙げられ、好ましくは、フェニル酢酸、プロモフェニル酢酸、クロロフェニル酢酸、フルオロフェニル酢酸などが挙げられる。

【0024】置換もしくは無置換のアリールカルボン酸としては、例えば水酸基、アミノ基、カルボキシル基、低級アルキル基、低級アルコキシカルボニル基、ホルミル基、低級脂肪酸アシル基、アルコキシ基、ハロゲン原子、ニトロ基またはシアノ基で置換されていてもよい安息香酸、ナフトエ酸が挙げられ、好ましくは、安息香酸、プロモ安息香酸、クロロ安息香酸、フルオロ安息香酸、ニトロ安息香酸、メチル安息香酸、ナフトエ酸、フルオロナフトエ酸などが挙げられる。

【0025】基Xの導入に用いる酸ハロゲン化物とは、キ酸ハロゲン化物、酢酸ハロゲン化物、水酸基が保護された乳酸ハロゲン化物、水酸基が保護された3-ヒドロキシプロピオン酸ハロゲン化物、水酸基が保護されたグリセリン酸ハロゲン化物、置換もしくは無置換の直鎖ないしは分岐鎖のアルキル基からなる炭素数4～10のアルキルカルボン酸のハロゲン化物、置換もしくは無置換のアラルキルカルボン酸のハロゲン化物、置換もしくは無置換のアリールカルボン酸のハロゲン化物である。

【0026】置換もしくは無置換の直鎖ないしは分岐鎖のアルキル基からなる炭素数4～10のアルキルカルボン酸のハロゲン化物としては、例えば水酸基、アミノ基、カルボキシル基、低級アルコキシカルボニル基、ホルミル基、低級脂肪酸アシル基、アルコキシ基、ハロゲン原子、ニトロ基またはシアノ基で置換されていてもよい酪酸、イソ酪酸、吉草酸、イソ吉草酸、ピバル酸などのハロゲン化物が挙げられ、好ましくは、ブチリルクロ



(5)

特開平7-101984

8

ライド、イソブチリルクロライド、バレリルクロライド、イソバレリルクロライド、ビバロイルクロライドなどが挙げられる。

【0027】置換もしくは無置換のアラルキルカルボン酸のハロゲン化物としては、例えば水酸基、アミノ基、カルボキシル基、低級アルコキシカルボニル基、ホルミル基、低級脂肪族アシル基、アルコキシ基、ハロゲン原子、ニトロ基またはシアノ基で置換されていてもよいフェニル酢酸のハロゲン化物が挙げられ、好ましくは、4-クロロフェニルアセチルクロライド、4-ブロモフェニルアセチルクロライド、4-フルオロフェニルアセチルクロライドなどが挙げられる。

【0028】置換もしくは無置換のアリールカルボン酸のハロゲン化物としては、例えば水酸基、アミノ基、カルボキシル基、低級アルキル基、低級アルコキシカルボニル基、ホルミル基、低級脂肪族アシル基、アルコキシ基、ハロゲン原子、ニトロ基またはシアノ基で置換されていてもよい安息香酸、ナフトエ酸のハロゲン化物が挙げられ、好ましくは、4-ブロモベンゾイルクロライド、4-クロロベンゾイルクロライド、4-フルオロベンゾイルクロライド、2-ニトロベンゾイルクロライド、3-ニトロベンゾイルクロライド、4-ニトロベンゾイルクロライド、1-ナフトイルクロライド、2-ナフトイルクロライド、4-フルオロ-1-ナフトイルクロライドなどが挙げられる。

【0029】H-Phe-Leu-Leu-Arg (Pmc)-Asn (Trt)-Rink樹脂またはH-Phe-Leu-Leu-Arg (Pmc)-Rink樹脂にカルボン酸無水物を作用させる反応は、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、DMF、N-メチルピロリドンなどの溶媒中、前記した樹脂に結合したペプチドに対して、カルボン酸無水物100モル%~800モル%、好ましくは、200モル%~400モル%であり、反応温度は通常10℃~28℃、好ましくは、15℃~28℃の範囲であり、反応は2時間~72時間、好ましくは、2時間~48時間行なわれる。

【0030】H-Phe-Leu-Leu-Arg (Pmc)-Asn (Trt)-Rink樹脂またはH-Phe-Leu-Leu-Arg (Pmc)-Rink樹脂にDCCおよびHOBtの存在下でカルボキシル基をもつ化合物を作用させる反応は、ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドンなどの溶媒中、前記した樹脂に結合したペプチドに対して、カルボキシル基をもつ化合物100モル%~800モル%、好ましくは、200モル%~400モル%で、DCC 100モル%~800モル%、好ましくは、200モル%~400モル%で、HOBt 100モル%~800モル%、好ましくは、200モル%~400モル%であり、反応温度は通常10℃~28℃、好ましくは、15℃~28℃の範囲であり、反応は2時間~72時間、好ましくは、2時間

~48時間行なわれる。

【0031】H-Phe-Leu-Leu-Arg (Pmc)-Asn (Trt)-Rink樹脂またはH-Phe-Leu-Leu-Arg (Pmc)-Rink樹脂にBOP試薬およびDIEAの存在下でカルボキシル基をもつ化合物を作用させる反応は、ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドンなどの溶媒中、前記した樹脂に結合したペプチドに対して、カルボキシル基をもつ化合物100モル%~800モル%、好ましくは、200モル%~400モル%で、BOP試薬100モル%~800モル%、好ましくは、200モル%~400モル%であり、DIEA 100モル%~800モル%、好ましくは、200モル%~400モル%であり、反応温度は通常10℃~28℃、好ましくは、15℃~28℃の範囲であり、反応は2時間~72時間、好ましくは、2時間~48時間行なわれる。

【0032】H-Phe-Leu-Leu-Arg (Pmc)-Asn (Trt)-Rink樹脂またはH-Phe-Leu-Leu-Arg (Pmc)-Rink樹脂に酸ハロゲン化物を作用させる反応は、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、DMF、N-メチルピロリドンなどの溶媒中、前記した樹脂に結合したペプチドに対して、酸ハロゲン化物100モル%~400モル%、好ましくは、100モル%~200モル%であり、反応温度は通常10℃~28℃、好ましくは、15℃~28℃の範囲であり、反応は2時間~72時間、好ましくは、2時間~48時間行なわれる。

【0033】H-Phe-Leu-Leu-Arg (Pmc)-Asn (Trt)-Rink樹脂またはH-Phe-Leu-Leu-Arg (Pmc)-Rink樹脂にβ-プロピオラクトンを作用させる反応は、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、DMF、N-メチルピロリドンなどの溶媒中、前記した樹脂に結合したペプチドに対して、β-プロピオラクトン 100モル%~800モル%、好ましくは、100モル%~400モル%であり、反応温度は通常10℃~28℃、好ましくは、15℃~28℃の範囲であり、反応は24時間~72時間、好ましくは、48時間~72時間行なわれる。

【0034】得られたペプチド誘導体は、通常、チオアニソール：エタンジチオール：m-クレゾール：TFA：TMSBrの混合溶液中で攪拌して脱保護した後、樹脂を除去して溶液を濃縮し、エーテルを加えることにより沈澱として得られる。得られた粗ペプチドを水または30%酢酸水溶液に溶解後、逆相ODSカラムに負荷して1%のTFAを含む $\text{CH}_3\text{CN}$ 溶液の $\text{CH}_3\text{CN}$ 濃度を6%から60%まで変化させるグラジエント溶出で精製される。

【0035】本発明のペプチド誘導体の純度検定は、分析用高速液体クロマトグラフィー（分析用HPLC）で行い、各ペプチド誘導体の構造は、FAB-マスマスペク

9

トロメーター (FAB-MS) で確認した。本発明のペプチド誘導体は、高速液体クロマトグラフ上で97%以上の純度を示し、各々のペプチド誘導体のFAB-MSのデータも理論値と一致した。また、各ペプチド誘導体の分析用HPLCにおける保持時間(Rt)を実施例中に示した。

分析用HPLCの条件

機器：島津LC-6A システム

カラム：YMC-Pack A-302 ODS 4.6φ×150mm

昇温溶媒：8%CH<sub>3</sub>CN/0.1%TFAから80%CH<sub>3</sub>CN/0.1%TFAまでの30分間リニアグラジェント

[0036]

【実施例】以下に実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこの実施例に限定されるものではない。

[0037] 参考例1：H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink樹脂の構築

ペプチドシンセサイザー430A (Applied Biosystems社製) を用いて、Fmoc型固相法によりペプチド-Rink樹脂を構築した。即ち、Rink樹脂 596mg (0.25mmol) より、DCC/HOBt/NMP法によって、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Phe-OHを順次縮合し、最後のサイクルでFmoc基を脱保護するプログラムで標記樹脂を構築した。

[0038] 参考例2：H-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Rink樹脂の構築

ペプチドシンセサイザー430A (Applied Biosystems社製) を用いて、Fmoc型固相法によりペプチド-Rink樹脂を構築した。即ち、Rink樹脂 676mg (0.25mmol) より、DCC/HOBt/NMP法によって、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Phe-OHを順次縮合し、最後のサイクルでFmoc基を脱保護するプログラムで標記樹脂を構築した。

[0039] 実施例1：H-β-Ala-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub>·2TFA (1) の合成

参考例1の方法を用いて構築したH-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink樹脂 387mg (0.125mmol) をDMF 7mlに懸濁し、Fmoc-β-Ala-OH 156mg (0.5mmol)、HOBt 68mg (0.5mmol)、DCC 103mg (0.5mmol)

(6)

特開平7-101984

10

を加えて、2日間振盪した。得られた樹脂をDMF、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で洗浄後、10%ピペラジン/DMF溶液 10mlを加え、20分間振盪した。さらに、樹脂をDMF、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で洗浄後、乾燥した。得られた樹脂 380mg (0.125mmol) をチオアニソール 1.17ml、エタンジチオール 0.585ml、m-クレゾール 0.2ml、TFA 7.48ml、TMSBr 1.35mlの混合溶液中で復持して脱保護した後、樹脂を除去して、溶液を濃縮した。濃縮液にエーテルを加え、ペプチドを沈澱させた。得られた粗ペプチドを水に溶解し、YMCバックカラム ODS-5 (20φ×250mm) に負荷し、精製した (緩衝液Aは0.1%TFA、緩衝液Bは0.1%TFAを含む60%CH<sub>3</sub>CN、流速は10ml/min、グラジェントはCH<sub>3</sub>CN濃度を6%から60%まで60分間で変化させた)。目的ペプチドを含む画分を凍結乾燥し、標記ペプチド誘導体(1) 95.3mgを得た。

FAB-MS: 732 [M+H]<sup>+</sup>

Rt: 12.14min

20 [0040] 実施例2：H-α-Aib-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub>·2TFA (2) の合成

参考例1の方法を用いて構築したH-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink樹脂 435mg (0.125mmol) をDMF 7mlに懸濁し、Boc-α-Aib-OH 204mg (1mmol)、HOBt 136mg (1mmol)、DCC 206mg (1mmol)を加え、2日間振盪した。得られた樹脂をDMF、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、MeOHで洗浄後、乾燥した。実施例1と同様に脱保護、精製を行い、標記ペプチド誘導体(2) 63.4mgを得た。

FAB-MS: 746 [M+H]<sup>+</sup>

Rt: 12.24min

[0041] 実施例3：H-DL-Ise-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub>·2TFA (3) の合成

参考例1の方法を用いて構築したH-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink樹脂 914mg (0.25mmol) をDMF 10mlに懸濁し、Fmoc-DL-Ise-OH 409mg (1.25mmol)、BOP試薬 553mg (1.25mmol)、DIEA 218μl (1.25mmol)を加え、7日間振盪した。得られた樹脂を濃縮し、DMF、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、MeOHで洗浄後、10%ピペラジン/DMF溶液中で20分間振盪し、DMF、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、MeOHで洗浄後、乾燥した。実施例1と同様に脱保護、精製を行い、標記ペプチド誘導体(3) 54.4mgを得た。

FAB-MS: 748 [M+H]<sup>+</sup>

(7)

特開平7-101984

11

Rt: 11.93 min

【0042】実施例4: HCO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> · TFA (4) の合成

参考例1の方法を用いて構築したH-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink樹脂 435mg (0.125mmol)をDMF 7mlに懸濁し、干酸 38μl (1mmol)、DCC 206mg (1mmol)、ピリジン 82μl (1mmol)を加え、2日間振盪した。得られた樹脂を濾過し、DMF、MeOHで洗浄後、乾燥した。実施例1と同様に脱保護、精製を行い、標記ペプチド誘導体(4) 33.0mgを得た。

FAB-MS: 689 [M+H]<sup>+</sup>

Rt: 14.15 min

【0043】実施例5: CH<sub>3</sub>CO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> · TFA (5) の合成

参考例1の方法を用いて構築したH-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink樹脂 435mg (0.125mmol)をDMF 7mlに懸濁し、無水酢酸 47μl (0.5mmol)、ピリジン41μl (0.5mmol)を加え、1日間振盪した。得られた樹脂を濾過し、DMF、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で洗浄後、乾燥した。実施例1と同様に脱保護、精製を行い、標記ペプチド誘導体(5) 80.0mgを得た。

FAB-MS: 703 [M+H]<sup>+</sup>

Rt: 14.70 min

【0044】実施例6: n-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> · TFA (6) の合成

参考例1の方法を用いて構築したH-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink樹脂 404mg (0.125mmol)をDMF 7mlに懸濁し、(n-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO)<sub>2</sub>O 82μl (0.5mmol)、ピリジン 41μl (0.5mmol)を加え、2日間振盪した。得られた樹脂を濾過し、DMF、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で洗浄後、乾燥した。実施例1と同様に脱保護、精製を行い、標記ペプチド誘導体(6) 84.4mgを得た。

FAB-MS: 731 [M+H]<sup>+</sup>

Rt: 16.90 min

【0045】実施例7: (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> · TFA (7) の合成

参考例1の方法を用いて構築したH-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink樹脂 404mg (0.125mmol)をDMF 7mlに懸濁し、[(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCO]<sub>2</sub>O 82μl (0.5mmol)、ピリジン 41μl (0.5

12

mmol)を加え、1日間振盪した。得られた樹脂を濾過し、DMF、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で洗浄後、乾燥した。実施例1と同様に脱保護、精製を行い、標記ペプチド誘導体(7) 92.8mgを得た。

FAB-MS: 731 [M+H]<sup>+</sup>

Rt: 16.92 min

【0046】実施例8: (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCO-Phe-Leu-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> · TFA (8) の合成

参考例2の方法を用いて構築したH-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Rink樹脂 445mg (0.125mmol)をDMF 7mlに懸濁し、[(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCO]<sub>2</sub>O 83μl (0.5mmol)、ピリジン41μl (0.5mmol)を加え、3日間振盪した。得られた樹脂を濾過し、DMF、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、MeOHで洗浄後、乾燥した。実施例1と同様に脱保護、精製を行い、標記ペプチド誘導体(8) 58.0mgを得た。

FAB-MS: 617 [M+H]<sup>+</sup>

20 Rt: 17.56 min

【0047】実施例9: (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CCO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> · TFA (9) の合成

参考例1の方法を用いて構築したH-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink樹脂 435mg (0.125mmol)をDMF 7mlに懸濁し、(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CCOOH 51mg (0.5mmol)、HOBt 68mg (0.5mmol)、DCC 103mg (0.5mmol)を加え、1日間振盪した。得られた樹脂を濾過し、DMF、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、MeOHで洗浄後、乾燥した。実施例1と同様に脱保護、精製を行い、標記ペプチド誘導体(9) 60.0mgを得た。

FAB-MS: 745 [M+H]<sup>+</sup>

Rt: 18.26 min

【0048】実施例10: HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> · TFA (10) の合成

参考例1の方法を用いて構築したH-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink樹脂 415mg (0.125mmol)をDMF 5mlに懸濁し、β-プロピオラクトン 63μl (1mmol)を加え2日間振盪した。得られた樹脂を濾過し、DMF、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で洗浄後、乾燥した。実施例1と同様に脱保護、精製を行い、標記ペプチド誘導体(10) 26.0mgを得た。

FAB-MS: 733 [M+H]<sup>+</sup>

Rt: 11.62 min

【0049】実施例11: L-Lactovl-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> · TFA

50

(8)

特開平7-101984

13

14

## (11)の合成

参考例1の方法を用いて構築したH-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink樹脂458mg(0.25mmol)をDMF 7mlに懸濁し、(+)-L-乳酸90mg(1mmol)、BOP試薬442mg(1mmol)、DIEA 274μl(1.575mmol)を加え、5時間振盪した。得られた樹脂を濾過し、DMF、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、MeOHで洗浄後、乾燥した。実施例1と同様に脱保護、精製を行い、標記ペプチド誘導体(11) 6.8mgを得た。

FAB-MS: 733 [M+H]<sup>+</sup>

Rt: 14.37min

【0050】実施例12: Benzoyl-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub>・TFA(12)の合成

参考例1の方法を用いて構築したH-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink樹脂408mg(0.125mmol)をDMF 7mlに懸濁し、安息香酸61mg(0.5mmol)、HOBt 68mg(0.5mmol)、DCC 103mg(0.5mmol)を加え、1日間振盪した。得られた樹脂をDMF、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、MeOHで洗浄後、乾燥した。実施例1と同様に脱保護、精製を行い、標記ペプチド誘導体(12) 21.0mgを得た。

FAB-MS: 765 [M+H]<sup>+</sup>

Rt: 18.23min

【0051】実施例13: Phenylacetate-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub>・TFA(13)の合成

参考例1の方法を用いて構築したH-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub>・TFA(13)の合成

\*Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink樹脂327mg(0.125mmol)をDMF 7mlに懸濁し、フェニル酢酸68mg(0.5mmol)、HOBt 68mg(0.5mmol)、DCC 103mg(0.5mmol)を加え、1日間振盪した。得られた樹脂を濾過し、DMF、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、MeOHで洗浄後、乾燥した。実施例1と同様に脱保護、精製を行い、標記ペプチド誘導体(13) 41.0mgを得た。

FAB-MS: 779 [M+H]<sup>+</sup>

Rt: 18.58min

【0052】実施例14: p-Bromobenzoyl-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub>・TFA(14)の合成

参考例1の方法を用いて構築したH-Phe-Leu-Leu-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Rink樹脂362mg(0.125mmol)を4-ブロモベンゾイルクロライド330mg(1.50mmol)でパラブロモベンゾイル化後、得られた樹脂を濾過し、DMF、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で洗浄後、乾燥した。実施例1と同様に脱保護、精製を行い、標記ペプチド誘導体(14) 5.5mgを得た。

FAB-MS: 843, 845 [M+H]<sup>+</sup>

Rt: 19.57min



【0053】試験例 血小板凝集反応の測定

合成したペプチド誘導体について、血小板凝集反応の測定を行い、その結果を第1表に示した(表中、血小板凝集活性をEC<sub>50</sub>で、血小板凝集阻害活性をIC<sub>50</sub>で示した)。

【0054】

【表1】

第1表

実施例番号	化合物番号	試験化合物	EC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
2	2	H-α-Aib-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH <sub>2</sub>	332.98±113.08	47.65±14.58
4	4	HCO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH <sub>2</sub>	62.38±11.04	8.61±3.30
5	5	CH <sub>3</sub> CO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH <sub>2</sub>	84.52±4.56	7.51±1.54
6	6	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH <sub>2</sub>	75.11±3.58	14.94±2.89
7	7	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH <sub>2</sub>	>100	39.38±10.67
11	11	L-Lactoyl-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH <sub>2</sub>	49.02±8.98	3.53±0.63
12	12	 CO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH <sub>2</sub>	>300	60.1±8.6
14	14	 CO-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH <sub>2</sub>	>300	86.8

【0055】(方法) 健康人血液を使用した。採血は、シリコンコーティングした3.13%クエン酸ナトリウムを1/10容量含む真空採血管で行った。血液を遠心分離(120×g、20分間)することにより多血小板

血漿(PRP)を調製した。トロンビンレセプターアゴニストペプチド: H-Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> (最終濃度1μMまたは2μM)を血小板凝集惹起薬として用い、Bornの比濁法

(9)

特開平7-101984

15

16

により血小板凝集反応を測定した。被験薬は蒸留水またはジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解して用いた。被験薬が水溶性の場合は、PRPに塩化カルシウムを添加(最終濃度1mM)した溶液210 $\mu$ lに、被験薬を20 $\mu$ l添加し、5分後に凝集惹起薬溶液を20 $\mu$ l添加して血小板凝集反応を測定した(総量250 $\mu$ l)。被験薬が脂溶性の場合は、PRPに塩化カルシウムを添加(最終濃度1mM)した溶液228 $\mu$ lに、被\*

\*被験薬を2 $\mu$ l添加し、5分後に凝集惹起薬溶液を20 $\mu$ l添加して血小板凝集反応を測定した(総量250 $\mu$ l)。

【0056】

【発明の効果】本発明のペプチド誘導体は、血小板凝集阻害活性があり、循環器系疾患治療薬としての有用性が期待できる。

---

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>

識別記号

片内整理番号

F I

技術表示箇所

C 0 7 K 14/705

8318-4H

// A 6 1 K 38/00

A B N

A C B